動物組織、血液、微生物用 ATP 抽出・測定試薬

XL-ATP kit
(ATP レベル検査キット)
使用説明書

【特徴】

・本品は ATP を効率的に抽出し、ルシフェラーゼ反応を用いて ATP 量を測定するための試薬キットです。

・本品に含まれる独自の抽出試薬およびプロトコールによって、高い ATP 抽出効率を実現しました。これまで正確な測定が困難であった動物組織や血液サンプルにおいても高感度かつ定量的に ATP 量を測定することが可能です。

・本品を用いて抽出した ATP は、-20 ℃ で半年間以上安定に保存することができます。

・本品は動物組織、血液、培養細胞、微生物などをサンプルとして用いることができます。

・本品で 50 回程度のサンプルの ATP の定量が可能です。

【注意事項】

・本品は国立大学法人徳島大学により、特許使用許諾を受けた(有)AEM 研究所の委託により、(株)アプロサイエンスが企画・販売する製品です。研究・商用利用問わず、本品を使用せずに無断で当該特許技術を利用することはできません。

・本品は研究以外の目的には使用しないで下さい。

・本品使用の際は、手袋、保護用メガネなどで身体保護を施し、試薬の身体への接触は避けて下さい。万一、試薬が目や皮膚に付着した場合は、応急処置として水で洗い流し、直ちに医師の診断を受けて下さい。

特願2008-017863 (国際出願番号 PCT/JP2009/051364)

APRO
株式会社アプロサイエンス
〒771-0360
徳島県鳴門市瀬戸町明神字板屋島 124-4
TEL 088-683-7211
FAX 088-683-7212
URL http://www.aprosci.com

【試薬】

・抽出試薬 A (医薬用外劇物: フェノール含有)	20 ml ×1 本
・抽出試薬 B (医薬用外劇物: クロロホルム含有)	30 ml ×1 本
・ルシフェラーゼ溶液	1 本
・ATP 標準液 (10^{-7} M)	500 μl ×1 本
・測定用緩衝液	6 ml ×1 本

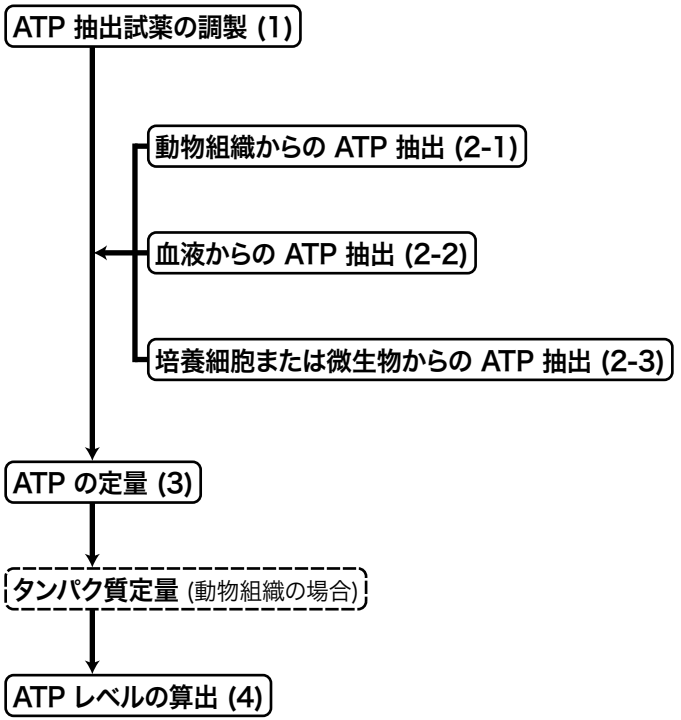
※ 本品は医薬用外劇物を含むため、容器や外箱の記載事項を完全に理解してからご使用ください。製品安全データシート (MSDS) は弊社ホームページ上にてご提供していますので、使用前にご確認下さい。

【使用期限】

6ヶ月 (未使用で -20℃ 保存の場合)

※ 本品を受け取り後、ただちに -20℃ で保存して下さい。
※ 測定用緩衝液で希釈したルシフェラーゼ溶液は保存出来ません。サンプルから抽出した「ATP 抽出溶液」は、-20℃ で半年以上安定に保存可能ですので、測定は出来るだけまとめて実施すると無駄がなく効率的です。
※ 開封後、異物の混入、微生物の増殖、変色などが認められた場合、使用をただちに中止して下さい。

【ATP 測定方法の概要】



【本品以外に準備するもの】

・ルミノメーター
・測定用チューブ (測定用プレート)
・遠心分離機
・マイクロピペッター
・プラスチックチップ / チューブ
・滅菌超純水 (比抵抗値 18 MΩ 以上)
・手袋 / 保護用メガネ
・ホモジナイザー (動物組織の測定の場合)
・生理食塩水 (培養細胞または微生物の測定の場合)

【プロトコール】

(1) ATP 抽出試薬の調製

1) 抽出試薬 A を室温で解凍します。

2) 下記の組成で「ATP 抽出試薬」をチューブに調製します。

抽出試薬 A	**300 μl**
抽出試薬 B	**500 μl**
滅菌超純水	**500 μl**
	1,300 μl

※ 解凍後、抽出試薬 A は 2 層に分離します。「ATP 抽出溶液」の調製には、下層 (黄色の層) を使用して下さい。

4) 使用時まで氷上で保存します。

(2-1) 動物組織からの ATP 抽出

1) 動物組織 0.1 - 0.2 g に滅菌超純水 3.0 ml を加えて、氷中でホモジナイズします。

※ 組織に血液が付着している場合は、滅菌超純水で洗浄します。

2) 遠心分離 (1,000 × g, 5 min, 4℃) をします。

3) 上清 0.5 ml を回収して、新しいチューブに移します。

※ 1) - 3) の操作は、ATP の分解を避けるためにできるだけ迅速に行ってください。

4) ATP 抽出試薬に上清 0.1 ml を添加後、10 秒間激しく撹拌します。

※ 残りの上清は凍結してタンパク質定量に用いることが可能です。組織のタンパク質を定量することで、組織のタンパク量に対する ATP 量を算出することを推奨します。

※ATP 抽出試薬と混合した上清は、-20℃で凍結保存が可能です。ATP の定量を開始する際は、サンプルを解凍後に撹拌して下さい。

5) 遠心分離 (10,000 × g, 5 min, 4℃) をします。

6) 遠心分離した後、上清 50 μl を新しいチューブに回収します。これを「ATP 抽出溶液」とします。

※上層の水層と下層のフェノール層の間に変性したタンパク質の層が認められますが、これは回収しないで下さい。また、タンパク質の層が多く、上清の回収が困難である場合はホモジナイズする組織の量を減らして下さい。

※ATP 抽出溶液は、-20℃で凍結保存が可能です。

(2-2) 血液からの ATP 抽出

1) 採血した血液 0.1 ml を先端を切断したチップで回収した後、その全量 (0.1 ml) を ATP 抽出試薬に添加します。

※血液の一部がチップ内に付着する場合は、よく洗います。

※採血した血液は、直ちに ATP 抽出試薬と混合して下さい。

2) 直ちに、20 秒間以上激しく撹拌します。

3) 遠心分離 (10,000 × g, 5 min, 4℃) をします。

4) 遠心分離した後、上清 50 μl を新しいチューブに回収します。これを「ATP 抽出溶液」とします。

※ATP 抽出溶液は、-20℃で凍結保存が可能です。

(2-3) 培養細胞または微生物からの ATP 抽出

1) 細胞または微生物を含む培養液をコニカルチューブに回収後、遠心分離 (1,000 - 10,000 × g, 5 min, 4℃) をします。

※細胞または微生物の湿重量が 0.1 - 0.2 g になるように、遠心する培養液の量を調整して下さい。

2) 上清を捨てて、生理食塩水 10.0 ml を加えて、細胞ペレットを細胞が壊れないように洗浄 (懸濁) します。

3) 再度、遠心分離 (1,000 - 10,000 × g, 5 min, 4℃) をします。

4) 上清を捨てて、生理食塩水 3.0 ml を加えた後、細胞ペレットを細胞が壊れないように洗浄 (再懸濁)します。

※生理食塩水の代わりに、PBS を使用しても問題はありません。

5) 細胞懸濁液 1.0 ml を回収して、新しいチューブに移します。

※残りの細胞懸濁液は、細胞数の計測に使用可能です。細胞数を計測することで、細胞数に対する ATP 量を算出することを推奨します。

6) ATP 抽出試薬に細胞懸濁液 0.1 ml を添加して、20 秒間激しく撹拌します。

7) 遠心分離 (10,000 × g, 5 min, 4℃) をします。

8) 遠心分離をした後、上清 100 μl を新しいチューブに回収します。これを「ATP 抽出溶液」とします。

※遠心した後、上層の水層と下層の中間に変性タンパク質の層が認められますが、これは回収しないで下さい。

※ATP 抽出溶液は、-20℃で凍結保存が可能です。

(3) ATP の定量

1) 測定用緩衝液を室温で融解します。

2) ルシフェラーゼ溶液の全量を測定用緩衝液 5.0 ml に添加した後、ゆっくりと混合します。

※一度、希釈したルシフェラーゼ溶液を再び凍結して、再度使用することは避けて下さい。

3) ATP 標準液を融解後、滅菌超純水で希釈して、10 倍希釈系列の溶液 (10^{-7} から 10^{-12} M) を調製します。

4) 希釈した ATP 標準液 10 μl に、ルシフェラーゼ溶液 90 μl を加えて混合した後、ルミノメーターで発光量 (RLU) を測定します。

※発光量を測定する際には、バックグラウンドとして滅菌超純水も併せて測定することを推奨します。

※ここでの発光量 (RLU) の値は、検量線の作成に使用します。

5) ATP 抽出溶液を滅菌超純水で任意の濃度に希釈する。

※使用するルミノメーターやサンプル等によって希釈倍率は異なります。動物組織の場合は 200 - 500 倍、血液の場合は 10,000 倍、培養細胞や微生物の場合は 10 - 100 倍の希釈が目安です。

※希釈を正確に行うことで、安定した結果が得られます。。

6) 希釈した ATP 抽出溶液 10 μl にルシフェラーゼ溶液 90 μl を加えて混合した後、ルミノメーターで発光量 (RLU) を測定します。

※この発光量 (RLU) の値がルミノメーターの検出限界を超える場合は、ATP 抽出溶液をさらに再希釈して測定して下さい。また、発光量の値が低い場合 (RLU > 50) は希釈倍率を下げます。

7) この発光量 (RLU) と検量線および希釈率から、組織中に含まれる ATP 量を算出します。

※算出方法の詳細につきましては、「(4) ATP レベルの算出」を参照して下さい。弊社のホームページより、ATP レベルを算出するためのフリーソフトウェア (Excel 形式) を配布しております。

(4) ATP レベルの算出

1) 弊社のホームページ (http://bio.aprosci,com/) 上の「研究支援製品」→「試薬」→「XL - ATP kit」にアクセスして、「仕様と価格」のページから「ATP Soft.xls」をダウンロードします。

2) ダウンロードした「ATP Soft.xls」を起動します。

3) サンプルの「シート」から解析したいシートを選択します。

※「動物組織 (g protein)」シートは、動物組織中のタンパク質量あたりの ATP レベルを算出できます。「細胞・微生物 (cells)」シートは、細胞または微生物の細胞数あたりの ATP レベルの算出に使用します。「血液 (ml)」シートは、血液の容量あたりの ATP レベルの算出に使用します。

4) 「検量線」の「発光量 (RLU)」のセルに 10 倍希釈系列の溶液 (10^{-7} から 10^{-12} M) の発光量 (RLU) を入力します。「0」のセルには滅菌超純水の値を入力して下さい。

5) 全てを入力すると検量線が作成されます。

6) 「ATP レベル算出シート」の「タンパク質 (mg/ml)」の列に、測定した動物組織のタンパク質濃度を入力します。

※この入力操作は、動物組織の場合のみ必要です。

7) 「ATP レベル算出シート」の「細胞数 (cells/ml)」の列には、計測した細胞または微生物の細胞数を入力します。

※この入力操作は、培養細胞または微生物の場合のみ必要です。

8) 「ATP レベル算出シート」の「希釈倍率」の列には、測定時の ATP 抽出溶液の希釈率を入力します。

※ATP 抽出溶液を 1,000 倍希釈して測定した場合、「1000」と入力して下さい。この入力操作は、動物組織あるいは培養細胞または微生物の場合のみ必要です。

9) 最後に、「ATP レベル算出シート」の「発光量 (RLU)」の列に、ルミノメーターで測定した ATP 抽出溶液の発光量 (RLU) を入力します。

「ATP レベル」の列に、それぞれのサンプルの ATP 量が表示されます。

※本品を用いても期待した結果が得られなかった場合は、別紙 (「トラブルシューティング」) を参考にして下さい。